

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

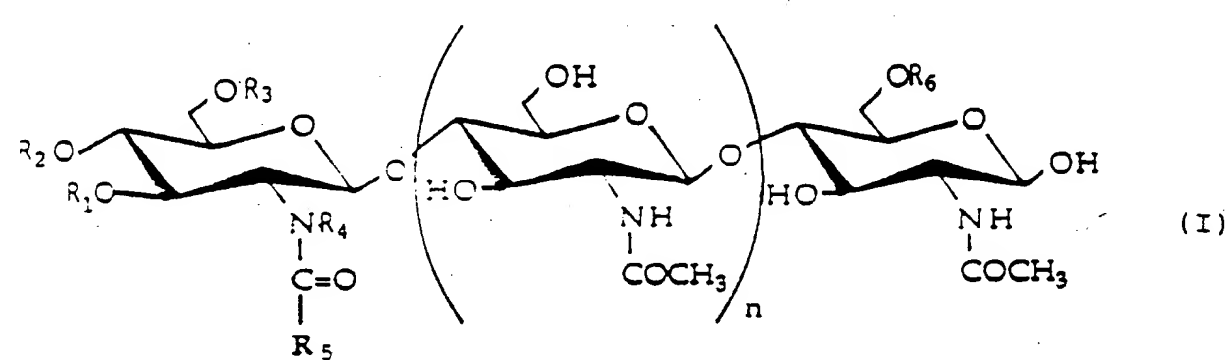
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :  <b>C07H 13/06, C08B 37/00</b>  <b>C12N 15/74, 1/21, C12P 19/26</b>  <b>A01N 63/02, A61K 31/70, 31/715</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 94/00466</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 6 janvier 1994 (06.01.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00653</p> <p>(22) Date de dépôt international: 29 juin 1993 (29.06.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:  92/07958 29 juin 1992 (29.06.92) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - I.N.R.A. [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BROUGHTON, William, John [AU/CH]; 4, rue de l'Encyclopédie, CH-1201 Genève (CH). DENARIE, Jean, Louis, Claude [FR/FR]; 18, rue du Moulin, F-31320 Castanet-Tolosan (FR). MAILLET, Fabienne, Chantal, Marie [FR/FR]; 5, Verte Vallée, F-31450 Pompertuzat (FR). PRICE, Neil, Philip, John [GB/US]; Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA 30602 (US). PROMÉ, Danielle, Jeanne, Claudine [FR/FR]; PROMÉ, Jean-Claude, Adrien, Paul [FR/FR]; 9, Lotissement La Bergerie, F-31320 Pechbusque (FR). RELIC, Biserka [YU/CH]; 18, rue des Caroubiers, CH-1227 Carouge (CH). TALMONT, Franck, Jean, Bernard [FR/FR]; 25, chemin de Heredia, F-31500 Toulouse (FR).</p>		
<p>(74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée  Avec rapport de recherche internationale.</p>		
<p>(54) Title: BROAD HOST SPECTRUM <i>RHIZOBIACEAE</i> NODULATION SIGNALS</p> <p>(54) Titre: SIGNAUX DE NODULATION DE <i>RHIZOBIACEAE</i> A LARGE SPECTRE D'HÔTE</p>		
		
<p>(57) Abstract</p> <p>Nod factors of general formula (I), wherein R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are a hydrogen atom, a carbamyl group or an acetyl group; R<sub>5</sub> is the aliphatic chain of a fatty acid; n is 1-4; and one or more of substituents R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> is a carbamyl group, and/or R<sub>4</sub> is a methyl group, and/or R<sub>6</sub> is an optionally substituted monosaccharide or oligosaccharide attached to the glucosamine via a glycoside bond.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention est relative à des facteurs Nod, de formule générale (I) dans laquelle: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou un groupe carbamyle ou un groupe acétyle; R<sub>5</sub> représente la chaîne aliphatique d'un acide gras; n est compris entre 1 et 4; et un ou plusieurs des substituants R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> ou R<sub>3</sub> est un groupe carbamyle, et/ou R<sub>4</sub> représente un groupe méthyle, et/ou R<sub>6</sub> représente un monosaccharide ou un oligosaccharide, éventuellement substitués, liés à la glucosamine par liaison glycosidique.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

# SIGNAUX DE NODULATION DE RHIZOBIACEAE A LARGE SPECTRE D'HOTE.

L'Invention est relative à l'obtention de nouveaux signaux de nodulation (facteurs Nod) à large spectre d'hôte.

Des bactéries du sol appartenant aux genres *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Rhizobium*, (désignées sous le terme général de *Rhizobia*) sont capables d'interagir avec les racines des légumineuses pour former des nodules dans lesquels elles fixent l'azote atmosphérique. Toutefois, seules certaines combinaisons bactéries/plantes conduisent à la nodulation, et la spécificité d'hôte des *Rhizobia* varie de façon importante [LONG, Cell. 56, 203 (1989)] ; [MARTINEZ et al., Crit. Rev. Plant Sci., 23, 483 (1990)] ; [DENARIE et al., in Molecular Signals in Plant-Microbe Communications, D.P.S. Verma Ed. p. 295-324 (CRC Press, Boca Raton, 1992)]. Certains *Rhizobia* (par exemple *R. leguminosarum* et *R. meliloti*) ne nodulent qu'un petit nombre d'espèces de légumineuses, alors qu'au contraire, d'autres ont un spectre d'hôte plus large et peuvent s'associer avec de nombreuses plantes.

La formation des nodules résulte de l'expression coordonnée de gènes de la plante et de gènes de la bactérie. L'expression des gènes de nodulation rhizobiaux (*nod*) est contrôlée par des gènes *nodD* de régulation, dont les produits sont activés par des flavonoides sécrétés par les racines des plantes. La capacité des protéines NodD à interagir avec les flavonoides de plantes de façon spécifique définit un premier niveau de spécificité d'hôte.

Il existe en outre deux catégories de gènes *nod* structuraux : les gènes communs et les gènes spécifiques. Les gènes *nodABC* sont communs à tous les *Rhizobia*, tandis que des gènes *nod* spécifiques d'espèce sont les déterminants majeurs de la spécificité d'hôte.

Il a été montré que, à la fois, les gènes *nod* communs et les gènes *nod* spécifiques sont impliqués dans la production de facteurs Nod extracellulaires qui provoquent la déformation de poils racinaires chez les légumineuses.

5 Certains des Inventeurs ont identifié chez *R. meliloti* des facteurs Nod, dénommés NodRm, qui sont des structures lipo-oligosaccharidiques, dont la biosynthèse est sous le contrôle des gènes communs *nodABC*, et qui sont des oligomères de glucosamines liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4, N-acylés sur la glucosamine terminale non

10 réductrice et N-acétylés sur les autres résidus glucosamine (Demande PCT FR/9100283 aux noms de l'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE et du CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE). La spécificité

15 d'hôte est ensuite déterminée par la nature des substituants portés par ce squelette commun. Chez *R. meliloti*, la fonction des gènes majeurs de spécificité d'hôte (*nodH* et *nodPQ*) est de déterminer la sulfatation de ces facteurs lipo-oligosaccharidiques [ROCHE et al., Cell, 67, 1131 (1991)], tandis que chez *R. leguminosarum*, les gènes *nodFE* contrôlent la synthèse d'un résidu lipidique hautement insaturé [SPAINK et al., Nature, 354, 125, (1991)].

La souche de *Rhizobium* sp. NGR234 occupe une

25 place unique chez les symbiotes des légumineuses ; elle possède en effet le spectre d'hôte le plus large de toutes les *Rhizobia* connues, et actuellement, on sait qu'elle provoque la nodulation de plus de 60 espèces de légumineuses. On compte en particulier parmi ces hôtes,

30 la plupart des légumineuses présentant un important intérêt commercial, tels que par exemple le soja ou l'arachide. Le *Rhizobium* NGR234 peut en outre provoquer la nodulation de plantes n'appartenant pas aux légumineuses, telles que par exemple, *Parasponia andersonii*.

35 Les Inventeurs ont cherché à isoler et à identifier les facteurs Nod responsables du large spectre

d'hôte de *Rhizobium* sp. NGR234, et sont parvenus à caractériser une nouvelle famille de facteurs Nod, dénommés facteurs NodNGR. Ces facteurs NodNGR sont des lipo-oligosaccharides qui appartiennent à la même famille que les  
5 facteurs NodRm déjà décrits par certains des Inventeurs (Demande PCT FR/9100283), mais présentent également des caractéristiques structurales qui permettent de les différencier des facteurs Nod Rm.

Premièrement, leur résidu glucosamine terminal  
10 réducteur est substitué en C6 par un autre sucre ;

Deuxièmement, leur glucosamine terminale non réductrice peut être estérifiée par un ou plusieurs groupes carbamyle ;

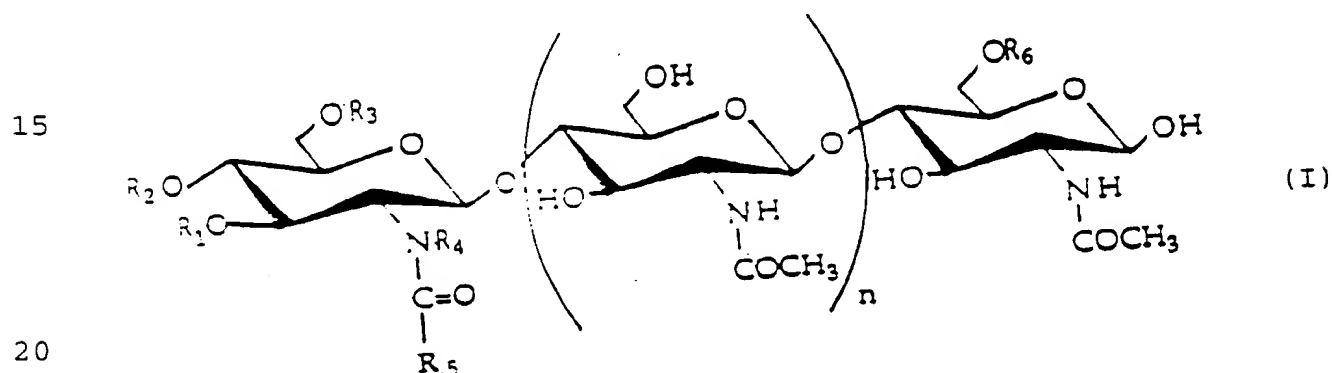
Troisièmement, l'atome d'azote qui est substitué par l'acide gras à longue chaîne est également  
15 méthylé.

En outre, les Inventeurs ont étudié la structure des facteurs Nod produits par diverses souches de Rhizobiacées, d'origine géographique très différente, et  
20 symbiotiques des hôtes les plus variés, comme *Rhizobium tropici* qui nodule les haricots et *Leucaena*, *Sinorhizobium fredii* qui nodule le soja, et *Azorhizobium caulinodans* symbiote de *Sesbania*. Ils ont constaté que les facteurs Nod produits par ces différentes souches  
25 possédaient au moins une des particularités structurales observées pour les facteurs NodNGR, telle que la présence d'un sucre sur la glucosamine terminale réductrice (*Sinorhizobium fredii*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium phaseoli*), ou d'un groupement N-méthyle sur la  
30 glucosamine terminale non-réductrice (*Rhizobium tropici*, *Azorhizobium caulinodans*).

Les nouveaux facteurs Nod conformes à l'Invention qui présentent au moins une des trois caractéristiques structurelles mentionnées ci-dessus, seront  
35 dénommés ci-après, de manière générale, facteurs Nod de type NodNGR.

Les facteurs Nod de type NodNGR obtenus à partir de NGR234 seront plus particulièrement dénommés ci-après facteurs NodNGR. Des facteurs Nod obtenus à partir des autres souches étudiées par les Inventeurs, et possédant au moins l'une de ces caractéristiques sont représentatifs des facteurs Nod de type NodNGR. Il apparaît que l'origine des facteurs Nod de type NodNGR peut être très variée

La présente Invention a pour objet des facteurs Nod de formule générale (I) ci-après :



dans laquelle :

-  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  représentent un atome d'hydrogène, ou un groupe carbamyle ou un groupe acétyle ;

-  $R_5$  représente la chaîne aliphatique d'un acide gras ;

-  $n$  est compris entre 1 et 4,

et caractérisés en ce que :

- un ou plusieurs des substituants  $R_1$ ,  $R_2$  ou  $R_3$  est un groupe carbamyle, et/ou

-  $R_4$  représente un groupe méthyle, et/ou

-  $R_6$  représente un monosaccharide ou un oligosaccharide, éventuellement substitués, liés à la glucosamine par liaison glycosidique.



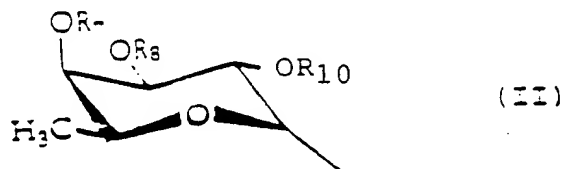
Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention,  $R_5$  représente la chaîne aliphatique d'un acide gras en  $C_{10-24}$ , de préférence  $C_{14-20}$ .

Selon une modalité préférée de ce mode de réalisation,  $R_5$  représente la chaîne aliphatique de l'acide vaccénique ou de l'acide palmitique.

L'acide vaccénique et l'acide palmitique sont les substituants majeurs observés dans les préparations de facteurs NodNGR obtenus à partir de *Rhizobium* NGR234 ; toutefois, une grande variété d'acides gras, variant tant par le nombre d'atomes de carbone de la chaîne aliphatique, que par son degré d'insaturation, ou par la présence sur ladite chaîne aliphatique de substituants tels que des groupes hydroxyle, a été observée ; aucune influence de ces variations sur l'activité des facteurs NodNGR n'a été constatée par les Inventeurs.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de la présente Invention,  $R_6$  est choisi parmi le groupe de monosaccharides comprenant le fucose et l'arabinose éventuellement substitués.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation,  $R_6$  répond à la formule générale (II) :



30

dans laquelle :

-  $R_7$  et  $R_8$  représentent un atome d'hydrogène, un groupe acétyle ou un groupe sulfate.

35 -  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle

Selon une modalité préférée de cette disposition, R<sub>7</sub> est un atome d'hydrogène et R<sub>8</sub> un groupe sulfate.

5 Selon une autre modalité préférée de cette disposition, R<sub>7</sub> est un groupe acétyle et R<sub>8</sub> un atome d'hydrogène.

Selon encore une autre modalité préférée de cette disposition, R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub> sont tous deux des atomes d'hydrogène.

10 Les facteurs NodNGR appartiennent à la même famille de molécules que les facteurs NodRm purifiés à partir de *R. meliloti*: tous possèdent le squelette commun de résidus de D-glucosamine liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,4, N-acylé sur la glucosamine terminale non  
15 réductrice et N-acétylé sur les autres résidus. Ces similarités de structure recourent les observations faites précédemment par certains des Inventeurs et confirment que chez tous les *Rhizobia*, la fonction des gènes *nodABC* est de contrôler la synthèse d'une ossature  
20 d'oligo-chitosane N-acylée et N-acétylée. Les travaux des Inventeurs mettent donc en évidence l'appartenance de facteurs Nod de toutes les *Rhizobiaceae* à la même famille chimique.

Dans les facteurs NodRm, la chaîne d'acide  
25 gras contient au moins une double liaison conjuguée qui semble jouer un rôle essentiel pour l'induction de méristèmes nodulaires ; au contraire, les facteurs NodNGR sont N-acylés par de l'acide vaccénique ou de l'acide palmitique, et ne possèdent donc pas de double liaison  
30 conjuguée. Dans les facteurs NodNGR, l'atome d'azote qui est substitué par l'acide gras à longue chaîne est également méthylé. Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse que certaines activités biologiques des lipo-oligosaccharides de type Nod exigeraient une  
35 configuration de structure définie à la jonction entre la partie lipidique et l'ossature saccharidique. Ces condi-

tions de structure seraient assurées par la double liaison conjuguée dans un cas, et par le groupement N-méthyle dans l'autre cas .

La famille des facteurs NodNGR est très étendue. L'analyse par spectrométrie de masse utilisant l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB-MS) ainsi que l'analyse par résonance magnétique nucléaire ont montré l'existence de variations suivantes dans les substituants :

10                   1) Le résidu de 2-O-méthyl-fucose peut être non substitué ou bien il peut être sulfaté en O-3 ou acétylé en O-4 ;

                  2) L'atome d'azote de la glucosamine terminale non réductrice peut être acylé par l'acide palmitique ou  
15 bien par l'acide vaccénique ;

                  3) Le nombre de substituants carbamyle sur la glucosamine terminale non réductrice varie entre aucun et deux.

Les combinaisons de ces différentes substitu-  
20 tions possibles conduisent à au moins 18 ( $= 3 \times 2 \times 3$ ) structures possibles si les sites de substitutions carbamyles sont fixés, et leur nombre peut même être plus grand dans la mesure où le ou les sites de substitution par les groupes carbamyle peuvent varier entre les  
25 positions 0-3, 0-4, et 0-6. On peut raisonnablement supposer que c'est notamment cette diversité de structures qui est responsable du large spectre d'hôte des facteurs NodNGR.

L'Invention a également pour objet des souches  
30 de *Rhizobia* surproductrices de facteurs de type NodNGR, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un plasmide recombinant exprimant un gène de régulation *nodD* de NGR234, et en particulier une souche de *Rhizobium* NGR234 surproductrice de facteurs Nod, obtenue en  
35 introduisant dans NGR234 un plasmide multicopie recombinant dénommé pA28, exprimant un gène de régulation

*nodD* de NGR234, afin d'augmenter le nombre de copies de ce gène, ce qui a pour effet de multiplier par au moins 10 la quantité de facteurs Nod produite.

L'Invention englobe également des plasmides recombinants portant le gène de régulation *nodD1* de NGR234 et en particulier le plasmide pA28 qui résulte de l'insertion d'un fragment *EcoRI-PstI* du plasmide pNGRH6 [BASSAM et al. Mol. Plant-Microbe Interact, 1, 161, (1988)], portant la région *nodD1* de NGR234, dans le plasmide pRK7813 [JONES and GUTTERSON, Gène, 61, 299-306. (1987)].

L'Invention concerne également un procédé de production de facteurs NodNGR ou de type NodNGR, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on procède à la mise en culture d'au moins une souche de *Rhizobia* productrice desdits facteurs Nod.

De préférence, on choisira une souche dans laquelle un plasmide conforme à l'Invention a été introduit.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de production de facteurs de type NodNGR conforme à l'invention, il comprend en outre, une étape au cours de laquelle on extrait, à partir de ladite culture de souches de *Rhizobia*, une ou plusieurs fractions comprenant lesdits facteurs.

Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, les facteurs NodNGR sont extraits à partir du surnageant de culture, par chromatographie en phase inverse, par absorption sur une colonne de silice sur laquelle sont greffés des groupements hydrophobes, comme des résidus octadécyle, suivie d'une élution par du méthanol.

La présente Invention a également pour objet un agent de traitement de plantes comprenant en tant que constituant actif, au moins un facteur NodNGR ou de type

NodNGR tel que défini plus haut, et qui est utilisable en particulier :

- comme un agent de stimulation des propriétés symbiotiques des légumineuses, notamment à l'égard de la  
5 fixation d'azote;

- comme un agent de stimulation des mécanismes de défense des plantes contre les pathogènes.

Préférentiellement, ledit agent de traitement des plantes comprend un mélange de facteurs NodNGR et/ou  
10 de facteurs de type NodNGR. Avantageusement, il peut également comprendre d'autres facteurs Nod, par exemple des facteurs de type NodRm.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'agent de traitement de plantes conforme à la présente  
15 Invention, celui-ci est inclus dans un support solide, tel que des granulés, ou bien formulé sous la forme d'une composition d'enrobage de graines ou d'une solution ou suspension aqueuse pour pulvérisation, dans laquelle un  
ou des facteurs Nod conformes à l'Invention sont présents  
20 seuls ou associés à d'autres constituants, tels que par exemple d'autres facteurs Nod.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'agent de traitement de plantes conforme à la présente Invention, un facteur ou chacun des constituants  
25 d'un mélange de facteurs Nod conformes à l'Invention sont présents dans les compositions d'enrobage ou les solutions ou suspensions aqueuses, à une concentration comprise entre  $10^{-6}$  M et  $10^{-14}$  M.

La présente Invention a en outre pour objet un  
30 agent thérapeutique, comprenant en tant que constituant actif au moins un facteur NodNGR ou de type NodNGR tel que défini plus haut.

Selon un mode de réalisation avantageux de cet agent thérapeutique, ledit facteur est présent dans  
35 l'agent thérapeutique à une concentration comprise entre  $10^{-4}$  M et  $10^{-8}$  M.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre.

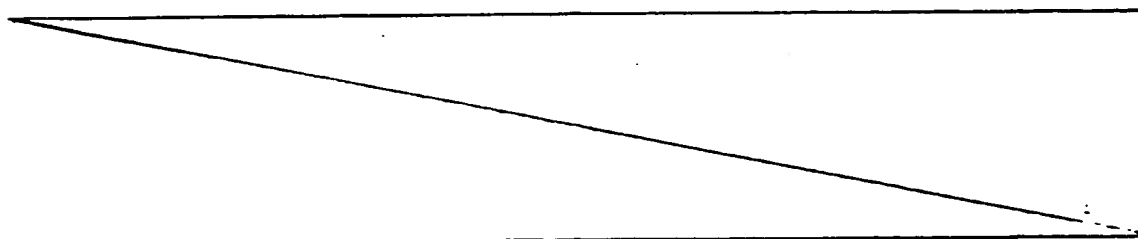
Il doit être bien entendu, toutefois que ces exemples, ainsi que les dessins annexés, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE BACTERIES RHIZOBIACEES SURPRODUCTRICE DE FACTEURS NodNGR**

La manipulation de la souche NGR234 et de son ADN a été effectuée comme décrit par BROUGHTON et al. (Arch. Microbiol. 141, 14 (1985) et PERRET et al (Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 1923 (1991), ou en utilisant des techniques classiques (J. SAMBROOK et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).

Un fragment EcoR1 de 2,9kb contenant la région *nodD1* de NRG234 a été excisé du plasmide pNGRH6 [BASSAM et al., Mol., Plant-Microbe Interact. 1, 161, (1988)] puis digéré par Pst1. Le fragment résultant EcoR1-Pst1 de 2,2 kb a été cloné dans pRK7813 au site Pst1 pour donner le plasmide pA28. pA28 est réintroduit dans *Rhizobium* sp. NGR234 (Rif<sup>R</sup>) par conjugaison. La souche résultante NGR(pA28) est surproductrice de facteurs Nod. Elle est Nod<sup>+</sup> sur *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, et *V. unguiculata*. La figure 1 représente la carte de restriction du fragment EcoR1. Les sites de restriction sont désignés comme suit :

B = BamH1, C = Cla1, E = EcoR1, P = Pst1,  
S = Sst1.



**EXEMPLE 2 : PURIFICATION DES FACTEURS NodNGR**

Les bactéries NGR234 ou NGR234(pA28) sont mises en culture à 27 °C sur milieu B+D (W.J. BROUGHTON and M.J. DILWORTH, Biochem. J. 125, 1075 (1971) contenant 5 12 mM de succinate, 6 mM de glutamate, 1 ml/litre de solution de vitamine B5 GAMBORG (Sigma, St. Louis, Mo) (= RMM3), jusqu'à la fin de la phase logarithmique.

Pour l'analyse par chromatographie en couche mince, 30 ml de bactéries (NGR 234) en culture sont 10 induites avec  $10^{-6}$  M d'apigénine, qui est un inducteur de l'expression des gènes *nodD* de NGR234, en présence de 1  $\mu$ Ci/ml de sulfate de sodium marqué au soufre 35, ou d'acétate de sodium marqué au carbone 14.

Les surnageants sont extraits sur des car- 15 touches SEPPAK C<sub>18</sub> (Waters Assoc., Milford, MA), lavés avec de l'eau distillée et élués au méthanol. Les extraits méthanoliques concentrés sont déposés sur des plaques de SILICAGEL 60 G (MERCK, DARMSTADT); la chroma- tographie est effectuée dans un mélange chloro- 20 forme:méthanol: 5 M NH<sub>4</sub>OH (5:4:1 en volume), et la plaque déposée sur un film FUJI RX (Fuji Photo Film Co, TOKYO).

L'induction des gènes *nod* par  $10^{-6}$ M d'apigénine en présence d'acétate marqué au <sup>14</sup>C ou de sulfate marqué au <sup>35</sup>S donne deux taches radioactives sur 25 des plaques de CCM. L'extraction des principes actifs contenus dans l'une et l'autre de ces taches permet l'obtention de substances qui déforment les poils racinaires de *Macroptilium*. Ceci montre que NGR234 sécrète des facteurs Nod contenant du soufre. En 30 revanche, aucune tache ne peut être détectée à partir d'un dérivé de NGR234 dans lequel les gènes *nodABC* ont été délétés. D'autre part, si l'on augmente le nombre de copies du gène *nodD1* (gène régulateur) en introduisant le plasmide pA28 dans NGR234, on observe un accroissement de 35 production de facteurs Nod, la quantité produite étant multipliée par 5 à 10.

Pour l'analyse chimique, les facteurs Nod ont été isolés à partir du surnageant de cultures de NGR234 contenant le plasmide pA28, après induction par l'apigénine. Cette production à plus grande échelle est effectuée à partir de 50 litres de culture de bactéries NGR234(pA28) préalablement induites par l'apigénine dans du milieu RMM3. Le matériel lipophile est récupéré sur une colonne phase inverse C<sub>18</sub> (LICHROSORB-18, 40µ, MERCK, DARMSTADT). La colonne est lavée avec 50 fois son volume d'eau distillée et éluée par 10 volumes de méthanol. La solution méthanolique est évaporée sous vide et diluée par 100 ml d'eau distillée. Après filtration, la solution aqueuse est extraite par 50 ml d'acétate d'éthyle pour extraire en particulier l'apigénine. La solution aqueuse est concentrée et les composés hydrosolubles sont séparés par HPLC préparative sur une colonne C<sub>18</sub> en phase inverse. L'élution est suivie à 206 nm. Le solvant est un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

Deux pics majeurs dénommés fractions A et B ont été collectés de la sorte. La fraction A (0,3 mg/l de la culture de départ) co-élue avec le matériel provenant de la culture marquée au soufre 35, alors que la fraction B (0,5 mg/l de la culture originelle) n'est pas marquée dans ces conditions. La comparaison des activités biologiques de ces deux fractions est décrite ci-dessous, à l'exemple 4.

### **EXEMPLE 3 : CARACTERISATION DES FACTEURS NodNGR**

L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique (4 M pendant 4 heures à 100 °C) de chacune des deux fractions libère des sucres et des acides gras. Les sucres ont été identifiés comme étant la D-glucosamine, la N-méthyl-D-glucosamine, et le 2-O-méthyl-L-fucose, que ce soit par chromatographie en phase vapeur, par spectrométrie de masse, (CPV-SM) de leur dérivés d'acétate d'alditol, ou bien par analyse en chromatographie en phase gazeuse de leur (+)-2-butanol-glycosides. Deux



acides ont été identifiés : le composant le plus important comme étant l'acide vaccénique (acide 11-Z-octadécénoïque) pendant que le composant mineur (environ 20% du total) a été identifié comme étant  
5 l'acide palmitique. L'existence d'un squelette commun constitué d'oligomères pentamériques de N-acétyl-glucosamine, portant plusieurs substituants a été déduite du spectre de masse FAB qui fait apparaître des séries d'ions séparées par 203 unités de masse (masse  
10 moléculaire d'un résidu N-acétyl-glucosamine).

La fraction A est un mélange de plusieurs composés sulfatés, comme le confirme la facilité avec lequel le radical  $\text{SO}_3$  est perdu en mode ion positif. Le poids moléculaire du composant majeur, déduit du spectre  
15 d'ions négatifs, est de 1595. D'autres composants dont la masse est inférieure de 43 ou de 26 unités de masse, ou une combinaison des deux, ont été détectés. Cette dernière différence correspond à celle qui existe entre le poids moléculaire de l'acide vaccénique et le poids  
20 moléculaire de l'acide palmitique. De même, la différence de 43 unités de masse, qui était répétée deux fois, a été attribuée à la présence ou l'absence de groupes CO-NH supplémentaires (résidus carbamyles). Le fait que cette empreinte de trois pics séparés par 43 unités de masse  
25 accompagnés de pics satellites distants de 26 unités de masse soit observée à chaque rupture de liaison glycosidique en mode d'ions positifs (formation d'ions oxénium) justifie la localisation des groupements carbamyles sur la glucosamine terminale non réductrice.  
30 De plus, si l'on soustrait de la masse des ions oxéniums à  $m/z$  440, 483, et 526 la masse d'un résidu vaccényle (cétène) et, selon les cas, celle de zéro, un ou deux groupes carbamyles (43 unités de masse), on obtient la masse de l'ion oxénium d'une méthyl-glucosamine. Ceci  
35 permet de localiser la N-méthyl-glucosamine à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide.

La fraction B est aussi un mélange. Deux composants majeurs ont été identifiés (poids moléculaires respectifs 1557 et 1515). La différence de 42 unités de masse entre ces deux composants suggère que le second est une forme monoacétylée du premier. D'autre part, comme dans la fraction A, d'autres composants dans lesquels la masse est plus faible de 43 ou 26 unités de masse sont également présents. Comme pour les composés de la fraction A, les groupes carbamyles sont localisés sur la N-méthyl-glucosamine terminale non réductrice portant le groupe N-acyle. Par contre le groupe acétyle additionnel n'étant présent dans aucun des ions oxéniums observés, celui-ci est localisé près de l'extrémité réductrice.

Le spectre de RMN du carbone 13 est compatible avec la présence de groupes carbamyles ( $\delta = 161,09, 160,62$  et  $159,80$  ppm) et celle des autres substituants décrits précédemment. Le spectre de RMN du proton attribue des configurations  $\beta$  pour les liaisons entre glucosamines et  $\alpha$  pour la liaison entre le 2-O-méthyl fucose et la glucosamine réductrice. Le spectre COSY montre une corrélation entre H-5 du fucose et un proton déblindé à  $\delta = 4,53$  ppm pour les composés de la fraction B. Ceci permet d'attribuer la position du groupe acétyle comme étant situé en O-4 du 2-O-méthyl-fucose. Parallèlement, le spectre COSY des composés de la fraction A montre une corrélation entre H-2 du 2-O-méthyl-fucose ( $3,67$  ppm) et le proton H-3 déblindé à  $\delta = 4,65$  ppm, permettant de localiser le groupe sulfate sur O-3 du 2-O-méthyl-fucose. Cette dernière attribution est confirmée par l'analyse des sucres obtenus par hydrolyse de la fraction A réduite et perméthylée, montrant la présence de diméthyl-2,4-fucose. De plus, l'identification de triméthyl 1,2,3,5 glucosaminitol dans les produits d'hydrolyse des fractions A ou B réduites et perméthylées permettent d'affirmer que le méthyl-fucose est glycosidiquement lié sur O-6 de la glucosamine réductrice. Enfin, cette

analyse indique également des liaisons 1-4 entre les diverses glucosamines. Les conditions de méthylation produisant l'élimination simultanée des groupes esters (acétates et carbamates), la position de ces groupes ne peut être établie par cette méthode. Toutefois, les composants majeurs des fractions A et B sont bi-carbamylés, alors que les espèces dépourvues de substituants carbamyle sont en minorité.

**EXEMPLE 4 : TEST DE CROISSANCE DES POILS RACINAIRES (Hai) ET DE DEFORMATION DES POILS RACINAIRES (Had) PROVOQUES PAR LES FACTEURS NOD SULFATES ET NON SULFATES DE RHIZOBIUM NGR234 SUR MACROPTILIUM ATROPURPUREUM, MEDICAGO SATIVA, VICIA SATIVA, ET VIGNA UNGUICULATA.**

Les deux fractions A et B, (sulfatée et non sulfatée) ont été séparées par chromatographie HPLC en phase inverse selon le protocole décrit dans l'exemple 2, et ont été testées séparément pour leur activité biologique.

Les tests Had (déformation des poils racinaires) sur *M. sativa* et Hai (prolifération et recourbement des poils racinaires) sur *V. sativa* ont été effectués comme décrits par ROCHE et al. [Cell., 76, 1131 (1991)]. Dans les tests Had pour *Macroptilium* et *Vigna*, des plantules stériles sont placées dans des tubes Eppendorf modifiés (dans lesquels le bouchon et une partie du fond ont été enlevés), et les tubes Eppendorf contenant les plantules sont suspendus dans des tubes test dont le fond est peint en noir afin de protéger les racines de la lumière, de façon à ce que l'extrémité des racines soit en contact avec 10 ml de milieu B + D. Après une incubation de 60 heures ( 16 heures de jour, 30°C ; 8 heures de nuit 20°C), les racines sont enlevées, colorées au bleu de méthylène, et examinées sous microscope à inversion. Les systèmes racinaires montrant clairement des branchements ou des recourbements (ramifications prolifiques ou recourbements à plus d'un endroit du

système racinaire) sont indiqués comme Had<sup>+</sup>. Les racines recouvertes de poils racinaires sont indiquées comme Hai<sup>+</sup>. 10 plantes ont été utilisées pour chaque traitement et dilution. En outre, 40 (*Macroptilium* et *Vigna*) et 60 (*Medicago* et *Vicia*) plantules sont utilisés comme plantes de contrôle (cultivées sur milieu seul), afin d'estimer la variabilité intrinsèque d'une plante à l'autre des caractères Had et Hai.

Les résultats sont représentés au tableau I ci-après. Ces résultats montrent le nombre de plantes (sur 10) qui montrent une activité Had ou Hai positive. Les nombres sont suivis par <sup>S</sup> quand la proportion de Had<sup>+</sup> ou Hai<sup>+</sup> est significativement plus élevée (probabilité P = 0,05) parmi les plantes traitées que parmi les contrôles (analyse faite en utilisant le test de Fisher).

- NodRm-IV(Ac,S) est le facteur Nod sulfaté majeur de la souche *R. meliloti* 2011. Il est utilisé comme contrôle positif de l'activité Had sur *Medicago*.

- NodRm-IV(Ac) est un facteur Nod non-sulfaté de mutants NodH<sup>-</sup> de *R. meliloti*. Il est utilisé comme contrôle positif de l'activité Hai sur *Vicia*.

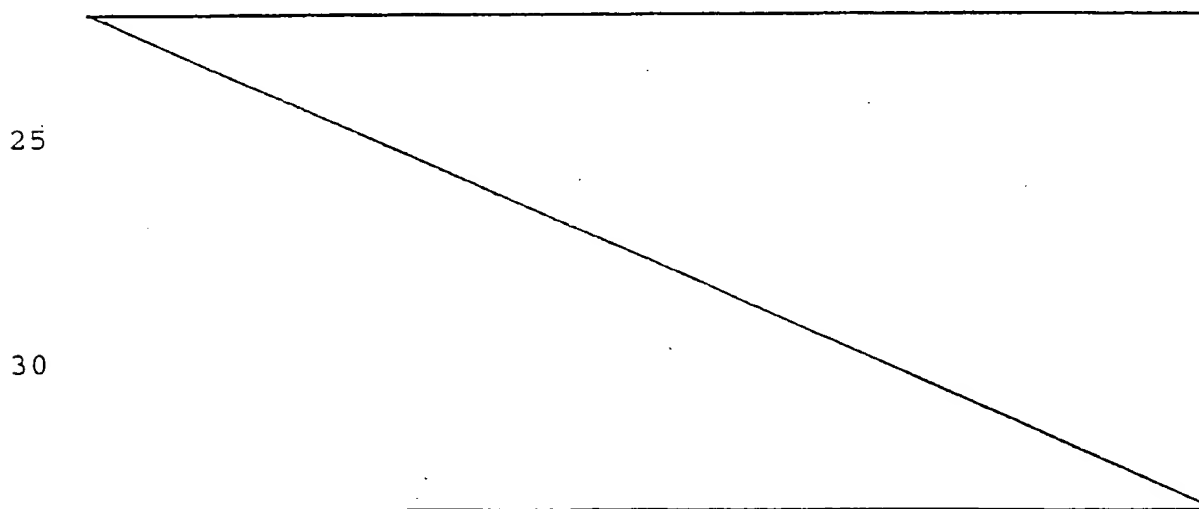


TABLEAU 1

CONCENTRATION FACTEUR Nod (M)							
	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-13</sup>
5	<i>Macroptilium</i> (Had)						
	NodNRG sulfaté						
	nt	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	7 <sup>S</sup>	3 <sup>S</sup>	0	
	NodNGR non-sulfaté						
	nt	10 <sup>S</sup>	9 <sup>S</sup>	4 <sup>S</sup>	1	0	
10	<i>Vigna</i> (Had)						
	NodNRG sulfaté						
	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	9 <sup>S</sup>	6 <sup>S</sup>
	NodNGR non-sulfaté						
15	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	8 <sup>S</sup>	5 <sup>S</sup>	4	nt
	<i>Medicago</i> (Had)						
	NodNRG sulfaté						
	9 <sup>S</sup>	8 <sup>S</sup>	9 <sup>S</sup>	5 <sup>S</sup>	3 <sup>S</sup>	1	
20	NodNGR non-sulfaté						
	5 <sup>S</sup>	1	2	0	1	1	
	NodRM-IV(AC,S)						
	nt	9 <sup>S</sup>	8 <sup>S</sup>	7 <sup>S</sup>	6 <sup>S</sup>	4 <sup>S</sup>	
25	<i>Vicia</i> (Hai)						
	NodNRG sulfaté						
	4 <sup>S</sup>	5 <sup>S</sup>	3 <sup>S</sup>	0	0	0	
	NodNGR non-sulfaté						
	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	9 <sup>S</sup>	2 <sup>S</sup>	0	0	
	NodRM-IV(Ac)						
	nt	10 <sup>S</sup>	10 <sup>S</sup>	8 <sup>S</sup>	2 <sup>S</sup>	0	

30 nt = non testé.

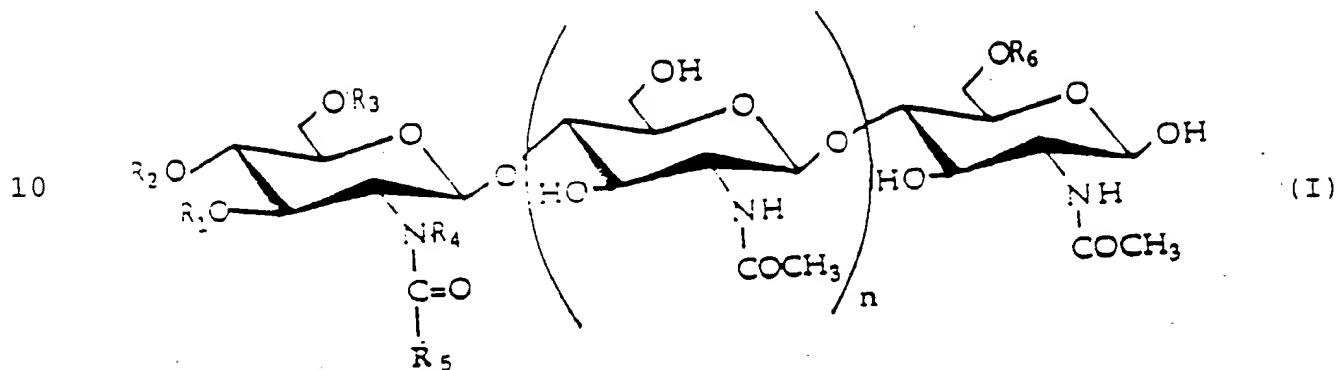
Dans les tests de déformation des poils racinaires (Had) effectués sur des plantes hôtes de NGR234, les deux groupes de facteurs NodNGR sont actifs à des concentrations aussi faibles que  $10^{-10}\text{M}/10^{-11}\text{M}$  sur *Macroptilium* et  $10^{-11}\text{M}/10^{-12}\text{M}$  sur *Vigna*. En outre, sur *Vigna*, les facteurs NodRm induisent non seulement des déformations du chevelu racinaire, mais également l'apparition de nombreux poils racinaires, ainsi que leur recourbement (Hai).

Les facteurs NodRm sulfatés obtenus à partir de *R. meliloti* sont Had<sup>+</sup> sur *Medicago sativa*, et Hai<sup>-</sup> sur *Vicia sativa* supsp. *nigra*. Au contraire, les facteurs NodRm non sulfatés sécrétés par des mutants NodH<sup>-</sup> de *R. meliloti* sont Had<sup>-</sup> sur *medicago* et Hai<sup>+</sup> sur *Vicia*. De manière intéressante, les facteurs NodNGR sulfatés et non sulfatés, présentent une activité biologique sur ces deux légumineuses. Les facteurs NodNGR sulfatés sont 10000 fois plus actifs que les facteurs non sulfatés sur *Medicago*, et provoquent la déformation du chevelu racinaire à des concentrations inférieures à  $10^{-11}$  molaire. Les facteurs NodNGR sulfatés diffèrent des facteurs NodRm sulfatés par de nombreux critères : par exemple, la présence de groupes carbamyle et d'un résidu méthyl-fucose, la localisation du groupe sulfate sur le fucose au lieu de la glucosamine, l'absence de double liaison conjuguée sur la chaîne acyle substituant l'azote, et la présence d'un groupe méthyle substituant l'azote. Cependant, les deux types de facteurs sont actifs sur *Medicago*, et leur activité diminue d'environ 10.000 fois quand le groupe sulfate est enlevé, ce qui démontre que *Medicago* est très sensible aux facteurs Nod sulfatés. Au contraire, chez *Vicia*, les composés non sulfatés sont plus actifs, et la déformation du chevelu racinaire est observée à des concentrations inférieures à  $10^{-11}\text{M}$ .

## REVENDICATIONS

1) Facteur Nod, dénommé facteur de type NodNGR de formule générale (I) ci-après :

5



15

dans laquelle :

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou un groupe carbamyle ou un groupe acétyle ;

- R<sub>5</sub> représente la chaîne aliphatique d'un acide gras ;

- n est compris entre 1 et 4, et caractérisé en ce que :

- un ou plusieurs des substituants R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> ou R<sub>3</sub> est un groupe carbamyle, et/ou

- R<sub>4</sub> représente un groupe méthyle, et/ou

- R<sub>6</sub> représente un monosaccharide ou un oligosaccharide, éventuellement substitués, liés à la glucosamine par liaison glycosidique .

2) Facteur Nod selon la Revendication 1, caractérisé en ce que R<sub>5</sub> représente la chaîne aliphatique d'un acide gras en C<sub>10-24</sub>, de préférence C<sub>14-20</sub>.

3) Facteur Nod selon la Revendication 2, caractérisé en ce que R<sub>5</sub> représente la chaîne aliphatique de l'acide vaccénique ou de l'acide palmitique.

4) Facteur Nod selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisé en ce que  $R_6$  est choisi parmi le groupe de monosaccharides comprenant le fucose et l'arabinose, éventuellement substitués.

5) Facteur Nod selon la Revendication 4, caractérisé en ce que  $R_6$  répond à la formule générale (II) :



15

dans laquelle :

-  $R_7$  et  $R_8$  représentent un atome d'hydrogène, un groupe acétyle ou un groupe sulfate.

20 -  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle.

6) Facteur Nod selon la Revendication 5, caractérisé en ce que  $R_7$  est un atome d'hydrogène et  $R_8$  un groupe sulfate.

25 7) Facteur Nod selon la Revendication 5, caractérisé en ce que  $R_7$  est un groupe acétyle et  $R_8$  un atome d'hydrogène.

8) Facteur Nod selon la Revendication 5, caractérisé en ce que  $R_7$  et  $R_8$  sont tous deux des atomes d'hydrogène.

30 9) Procédé de production de facteurs de type NodNGR<sub>2</sub> selon l'une quelconque des Revendications 1 à 8, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on procède à la culture d'au moins une souche de Rhizobiaceae productrice desdits facteurs Nod, et une étape au cours de laquelle on



procède à la purification desdits facteurs NodNGR à partir de la culture.

10) Procédé selon la Revendication 9, caractérisé en ce que ladite souche est une souche  
5 surproductrice de facteurs NodNGR, comprenant au moins un plasmide portant un ou plusieurs gènes de régulation *nodD* de Rhizobiacées choisies dans le groupe comprenant les genres *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*.

10 11) Procédé selon la Revendication 10, caractérisé en ce que ledit plasmide résulte de l'insertion d'un fragment *EcoRI*-*PstI* comprenant le gène de régulation *nodD1* de la souche NGR234 dans le plasmide pRK7813.

15 12) Procédé selon une quelconque des revendications 9 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, une étape au cours de laquelle on extrait, à partir de ladite culture de Rhizobiacées, une ou plusieurs fractions comprenant les facteurs de type  
20 NodNGR.

13) Procédé selon la Revendication 12, caractérisé en ce que les facteurs de type NodNGR sont extraits à partir du surnageant de culture, par absorption sur une colonne de silice sur laquelle sont  
25 greffés des groupements hydrophobes, suivie d'une élution par du méthanol.

14) Plasmide recombinant pour la mise en oeuvre du procédé selon la Revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend un ou plusieurs gènes de régulation  
30 *nodD* de Rhizobiacées choisies dans le groupe comprenant les genres *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*.

15) Plasmide recombinant selon la Revendication 14, dénommé pA28, caractérisé en ce qu'il  
35 résulte de l'insertion d'un fragment *EcoRI*-*PstI* comprenant le gène de régulation *nodD1* de la souche

NGR234 dans le plasmide pRK7813.

16) Souches de *Rhizobiacées* surproductrices de facteurs de type NodNGR, pour la mise en oeuvre du procédé selon la Revendication 10, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un plasmide recombinant, selon l'une quelconque des Revendications 14 ou 15.

17) Agent de traitement de plantes caractérisé en ce qu'il comprend en tant que constituant actif, au moins un facteur de type NodNGR ou un mélange de facteurs de type NodNGR, selon l'une quelconque des Revendications 1 à 8.

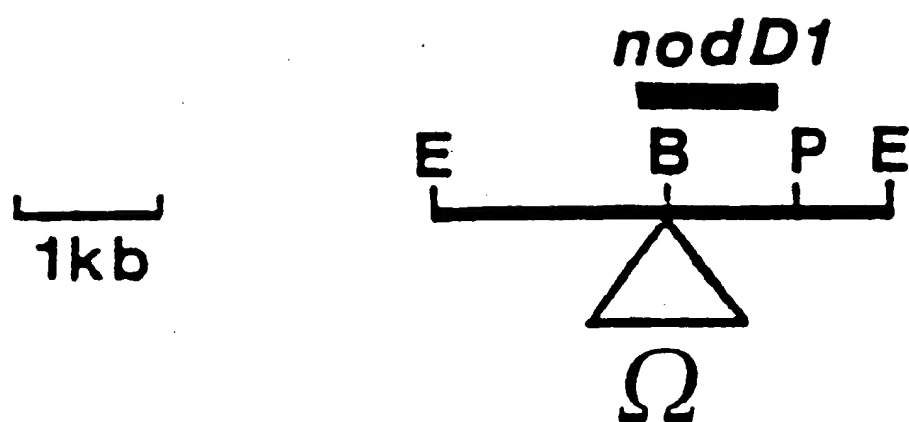
18) Agent de traitement des plantes, selon la Revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend en outre d'autres facteurs Nod.

19) Agent de traitement de plantes selon la Revendication 17, caractérisé en ce qu'il est inclus dans un support solide, ou formulé sous la forme d'une composition d'enrobage de graines ou d'une solution ou suspension aqueuse pour pulvérisation.

20) Agent de traitement de plantes selon la Revendication 17, caractérisé en ce que le facteur de type NodNGR ou chacun des constituants du mélange de facteurs de type NodNGR est présent à une concentration comprise entre  $10^{-6}$  M et  $10^{-14}$  M.

25

1/1

FIGURE 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00653

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup>: C 07 H 13/06; C 08 B 37/00; C 12 N 15/74; C 12 N 1/21  
C 12 P 19/26; A 01 N 63/02; A 61 K 31/70; A 61 K 31/715  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup>: C 07 H; C 12 N; C 08 B; C 12 P  
A 01 N; A 61 K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 115 496 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.) 17 October 1991 cited in the application see the whole document	1-21
A	EP, A, 0 330 715 (DAIICHI SEIYAKU CO., LTD.) 6 September 1989 see abstract	1, 20, 21
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, 1989, Columbus, Ohio, US; abstract No: 232023c, K. SATO 'Preparation of tri-N-acylchitotrioses as Pharmaceuticals and Plant Growth Regulators' page 689; column 1; see abstract & JP, A, 63 255 294 (IHARA CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD....) 21 October 1988	1, 16-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 1993 (17.08.93)

Date of mailing of the international search report

14 September 1993 (14.09.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300653  
SA 75841

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 17/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9115496	17-10-91	FR-A- 2660658	11-10-91
		AU-A- 7767891	30-10-91
		EP-A- 0523186	20-01-93
-----			
EP-A-0330715	06-09-89	AU-B- 595987	12-04-90
		AU-A- 1254188	07-09-89
		US-A- 5006647	09-04-91
		US-A- 5134230	28-07-92
		ZA-A- 8801430	28-10-88
-----			

EPO FORM P0079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No.

PCT/FR 93/00653

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous,)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C07H13/06; C12P19/26;	C08B37/00; A01N63/02;	C12N15/74; A61K31/70; C12N1/21 A61K31/715
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07H ; A01N ;	C12N ; A61K ; C08B ; C12P
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
A	WO,A,9 115 496 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.) 17 Octobre 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-21
A	EP,A,0 330 715 (DAIICHI SEIYAKU CO., LTD.) 6 Septembre 1989 voir abrégé --- -/-	1,20,21
<p>° Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
17 AOUT 1993	14. 09. 93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	SCOTT J.R.	

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA  
DEUXIEME FEUILLE)

Formulaire PCT/ISA/210 (feuille supplémentaire) (Octobre 1981)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300653  
SA 75841

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

17/08/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9115496	17-10-91	FR-A- 2660658	11-10-91
		AU-A- 7767891	30-10-91
		EP-A- 0523186	20-01-93
-----			
EP-A-0330715	06-09-89	AU-B- 595987	12-04-90
		AU-A- 1254188	07-09-89
		US-A- 5006647	09-04-91
		US-A- 5134230	28-07-92
		ZA-A- 8801430	28-10-88
-----			

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82